

Aus dem Pathologischen Institut der Freien Universität Berlin
im Städtischen Krankenhaus Westend
Direktor: Professor Dr. med. Wilhelm Maßhoff

ÜBER DEN CHEMISCHEN UND MORPHOLOGISCHEN
NACHWEIS VON FREIEN HÖHEREN FETTSÄUREN
IM AUTOLYSIERENDEN PANKREAS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Marianne Mütter geb. Jöllenbeck

aus Kiel

1967

Dekan: Professor Dr. med. Alfred N. W i t t
Referent: Priv. Doz. Dr. med. Friedrich L i n d l a r
Korreferent: Professor Dr. med. Hans-Joachim D u l c e



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin.

Promoviert am/: 6. 4. 1967

Über den chemischen und morphologischen Nachweis von
freien höheren Fettsäuren im autolysierenden Pankreas.

	<u>Seite:</u>
I. Einleitung	1
A) Frühere Untersuchungen zur Autolyse	1
B) Definition der Autolyse	4
C) Vorkommen der Zelllipide	4
D) Über den Einfluß der Autolyse auf Zelli- pide	5
E) Eigene Zielsetzung	6
II. Eigene Untersuchungen	8
A) Material	8
B) Autolyse und chemische Analyse	8
1. Durchführung der Autolyse	8
2. Herstellung der Organextrakte	8
3. Bestimmung der Säurezahl in den Lipid- extrakten	10
4. Dünnschichtchromatographie der Lipidextrak- te	10
5. Papierchromatographie der Lipidextrakte	11
C) Histochemie	12
D) Enzymhistochemie	13
E) Ergebnisse	13
1. der chemischen Analyse	13
2. der histochemischen und enzymhistochemi- schen Untersuchungen	15
III. Diskussion	19
IV. Zusammenfassung	22
V. Literatur	24 - 27



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533915_0024

I. Einleitung.

A) Frühere Untersuchungen zur Autolyse

1899 erschien ein Bericht von PFÖRRINGER über die Selbstverdauung des Pankreas. Der Autor beschreibt seine Untersuchungen an hundert bei der Obduktion entnommenen menschlichen Pankreasdrüsen und kommt zu dem Schluß, daß in einer sehr großen Anzahl von Fällen das Pankreas die Fähigkeit besitzt, sich post mortem, zuweilen schon in der Agone, selbst zu verdauen. In der Leiche soll die Umwandlung des Zymogens in wirksames Ferment und damit die Möglichkeit einer ausgedehnten Selbstverdauung in größerem Maße erst nach einer Reihe von Stunden erfolgen.

F.MÜLLER (1902) führt in seiner Arbeit über die Bedeutung der Autolyse bei einigen krankhaften Zuständen aus:

"Die Umwandlung der soliden Produkte in gelöster Form stellt also einen Verdauungsprozeß dar. Erwiesen ist der fermentative Charakter der Autolyse bisher nur für die Leukozyten, die Leber und einige andere parenchymatöse Organe."

Wenn auch F.MÜLLER zu weit gegangen ist, als er glaubte, mit seinen an totem Gewebsgut beobachteten autolysebedingten Veränderungen intravitale krankhafte Vorgänge erklären zu können, dürfen wir dennoch seine Arbeiten als Grundlage für die Erforschung der Autolyse betrachten. Diese war damals soweit definiert, daß man darunter Selbstverdauung durch Fermente verstand. Es sei am Rande vermerkt, daß die Natur der Fermentwirkungen schon 1836 von dem schwedischen Chemiker BERZELIUS beschrieben wurde. Er erkannte die Fermente als Katalysatoren, die in lebenden Organismen chemische Reaktionen hervorrufen (zit.LEUTHARDT 1961).

Wie weit die Kenntnisse der Vorgänge bei der Autolyse zu Fehldeutungen hinsichtlich physiologischer Prozesse ver-

leiten konnten, zeigt beispielsweise eine Arbeit von MATTHES (1902) über die Autolyse der Plazenta. Der Autor bemerkt zunächst ganz richtig, daß die bei der Autolyse auftretenden Produkte sich mit den bekannten Produkten der peptischen oder tryptischen Eiweißverdauung decken. Dann folgert er aber fälschlicherweise, daß die nach Untersuchung der Plazenta in zehn Fällen post mortem erzielten "positiven" Resultate die alte Annahme erklärten, daß die Plazenta die von der Mutter zugeführten Stoffe durch eine Art von Verdauung für den Fötus brauchbar mache. Die Fähigkeit des Plazentasaftes, Eiweiß zu spalten, erkläre die Passage der Eiweißkörper des mütterlichen Blutes durch die Plazenta in den Fötus.

Die Bedeutung der Autolyse für "die an aseptisch aufbewahrten Organen auftretenden morphologischen Veränderungen" wird von DIETRICH (1903) ausführlich gewürdigt. DIETRICH geht von einer 1891 erschienenen Arbeit SALKOWSKIs aus, in der dieser darlegt, daß zerkleinerte Organe, z.B. Leber, vor Fäulnis geschützt und bei 37°C aufbewahrt, nach einiger Zeit chemische Umsetzungen erfahren, die sich in einem Abbau der Eiweißkörper äußerten.

SALKOWSKI bezeichnete diesen Vorgang als Autodigestion und führte ihn auf Fermentwirkungen zurück. SALKOWSKIs Untersuchungen wurden vor allem durch JAKOBY im Laboratorium HOFMEISTERS erweitert. DIETRICH berichtet, JAKOBY habe das Ferment, welches die Autolyse verursacht, dargestellt, habe ihm eine weitgehende physiologische Bedeutung zugeschrieben und auf die Rolle hingewiesen, die es wohl auch bei pathologischen Prozessen spiele. JAKOBY halte den Eiweißzerfall, wie er bei der Autodigestion (besser Autolyse) auftrete, nicht nur für eine Absterbeerscheinung der Zellen, vielmehr entfalte das eiweißspaltende Ferment schon im Zelleben, im intermediären Stoffwechsel seine Tätigkeit. Der Unterschied der postmortalen Verdauung bestehe nur darin, daß durch das Aufhören der

Zirkulation das Material, welches durch das autolysierende Ferment umgesetzt werde, nicht mehr erneuert würde und die Produkte nicht mehr fortgeschafft werden könnten. DIETRICH stellt daraufhin die Frage, ob die Art der morphologischen Veränderungen der Organe auf die Einwirkung eines intrazellulären Fermentes bezogen werden könnte, oder ob die morphologisch registrierbaren Vorgänge eine andere Deutung des Autolyseprozesses zuließen. Nach systematischen Autolyseversuchen an Leber, Niere und Muskel führen die histologischen Ergebnisse DIETRICH aber zu dem Ergebnis, daß man aus ihnen nicht schließen könne, daß bei der Autolyse ein bereits im Zelleben wirkendes Ferment die Strukturveränderungen an der Zelle vollbringe. Im Vordergrund der morphologischen Vorgänge stünden die Umlagerungen im Zellkern als seine Absterbeerscheinungen. Es sei möglich, daß erst durch diese "molekularphysikalischen" Umsetzungen die Fermente sich bildeten oder frei würden, welche dann den weiteren Abbau der Moleküle besorgten. Aber es müsse davor gewarnt werden, der Entdeckung der autolytischen und der durch sie bedingten Abbauprozesse eine zu weitgehende Bedeutung zuzuschreiben; bei den nekrobiotischen Prozessen im Körper seien sie wahrscheinlich überhaupt nicht tätig. Während also JAKOBY eine Vorstellung vom Wesen der Autolyse entwickelt, die der heutigen weitgehend entspricht, glaubt DIETRICH aus seinen histologischen Untersuchungen schließen zu müssen, daß ein intravital wirksames Ferment für die Autolyse nicht verantwortlich sein könne.

Ältere Studien über die Autolyse beschäftigen sich vor allem mit den Veränderungen des Kohlenhydrat- und Eiweißanteils der Zellen (zit. SCHLEYER 1958). Es wird anhand von Untersuchungen über den Glukoseabfall die postmortale Glykolyse, die Abnahme des Glykogens im Muskel und die Zunahme der Milchsäure beschrieben. Es wird über die regelmäßige Zunahme der Aminosäuren, über den Anstieg des Gesamt-N und der Harnsäure berichtet. Als einziger Rest-N-Bestandteil, der postmortal kaum Veränderungen erfährt, wird das Kreatinin angeführt.

B) Definition der Autolyse

Wir verstehen unter Autolyse oder Selbstauflösung die durch intrazelluläre Fermente bewirkten Abbauvorgänge in toter Substanz. Zellfermente sind nur unter bestimmten Voraussetzungen, zu denen auch die Wasserstoffionenkonzentration zählt, wirksam. In der lebenden Zelle treten Fermente immer nur für kurze Zeit in Aktion, nämlich dann, wenn der Stoffwechsel dies verlangt. Nach Unterbrechung des normalen Stoffwechsels, beispielsweise nach dem Individualtod, führen mangelhafte Abfuhr von Schlacken und der Fortfall der Pufferungsfähigkeit des Blutes u.a. dazu, daß sich die Wasserstoffionenkonzentration nach der sauren Seite verschiebt. Dies soll eine der Voraussetzungen für die intrazellulären Fermente sein, ihre Wirksamkeit so zu entfalten, daß es schließlich zu den Auflösungsvorgängen kommt, die die Ursache der Leichenerscheinungen darstellen (LETTERER). Die an Leichenorganen auftretenden pH-Verschiebungen und ihre Beziehung zur Autolyse sind hinlänglich untersucht (SCHLEYER, 1958). BOHLEY u. HANSON (1964) konnten experimentell beweisen, daß für die postmortale starke Glykogenolyse, die deutliche Eiweißfreisetzung, die geringe Autoproteolyse und die Harnstoffbildung weder eine Verschiebung des pH-Wertes ins Saure noch eine Anhäufung von Spaltprodukten erforderlich sind. Bei dem komplexen System der Fermente, Antifermente, Aktivatoren und Inhibitoren kann natürlich kein Zweifel bestehen, daß zahlreiche Faktoren bei der postmortalen Fermentaktivierung eine Rolle spielen. Ferner sind bei der Autolyse nicht nur enzymatische, sondern auch säurekatalytische und spontane Abbauvorgänge zu berücksichtigen (MASSHOFF u. Mitarb. 1963).

C) Vorkommen der Zelllipide

Lipide kommen in allen Zellen des Organismus in strukturgebundener und freier Form in unterschiedlicher Menge vor. Unter "strukturgebunden" versteht man die Anwesenheit

von Fetten und fettähnlichen Stoffen in endoplasmatischem Retikulum, Mitochondrien, Kernen und limitierenden Zellbestandteilen. Zu den freien zytoplasmatischen Lipiden gehören vor allem die Neutralfette und die freien Fettsäuren, mitunter auch das Cholesterin und dessen Ester. Strukturgebunden sind neben Cholesterin vor allem die Phosphatide (Lecithine, Kephaline, Inositphosphatide, Phosphatidsäure, Plasmalogene, Cardiolipin, Sphingomyeline) und die phosphorfreien Glykolipoide von der Art der Cerebroside und Ganglioside. Die Phosphatide sind bis zu 95% an der Strukturbildung des endoplasmatischen Retikulum, der Mitochondrien und Kerne beteiligt (WALLACH u. Mitarb. -1960-).

D) Über den Einfluß der Autolyse auf Zelllipide

Werden Organe der Autolyse unterworfen, so kommt es (z.T. durch fermentative Mechanismen) zu histologisch registrierbaren Veränderungen an den Lipiden wie Fettschwund, Quellung und Basophilie. Die Basophilie von Fettstoffen beruht auf der Dissoziation saurer Gruppen und ist für saure Lipide, zu denen wir vor allem freie Fettsäuren (im folgenden als FFS bezeichnet) und Phosphatide rechnen, charakteristisch. Die Basophilie soll nach SINAPIUS (1962) eine wesentliche, wahrscheinlich mehr als 30% betragende Beimengung saurer Lipide beweisen. Soweit sich eine Basophilie unter der Wirkung fettspaltender Fermente sekundär entwickelt, dürfte sie nur durch freie Fettsäuren bedingt sein. Wahrscheinlich entspricht die Intensität der basophilen Färbung dem Ausmaß hydrolytischer Fettspaltung. Die Ausflösung von Neutralfettstoffen läßt sich bisher noch nicht befriedigend erklären. Die durch die Wirkung der Lipasen und Esterasen entstehende Säuerung soll das Zusammenfließen der Fetteilchen zu typischen sog. Autolysekörnchen bewirken. (SINAPIUS).

Daß die Autolysekörnchen durch die Wirkung fettspaltender Enzyme von der Art der Lipasen und Esterasen hervorgerufen wird, geht daraus hervor, daß Hemmung oder Inaktivierung dieser Enzyme das Auftreten der Autolysekörnchen

verhindern. Spärliche Autolyselipide sprechen für geringe, reichliche für starke Lipaseaktivität.

Während der Autolyse des Pankreas kommt es nach etwa 12 Std. zum Auftreten von Lysophosphatiden (MASSHOFF u. Mitarb. 1964). Diese entstehen aus Esterphosphatiden durch Abspaltung des ersten Fettsäuremoleküls oder aus Plasmalogen durch Abspaltung des Aldehyd. Verantwortlich für die Esterphosphatidspaltung mit Umwandlung in Lysophosphatide ist die Phospholipase A, die in zahlreichen Säugerorganen vorkommt und von MAGEE (1962) in besonders reichlicher Menge aus menschlichem Pankreas dargestellt wurde. Plasmalogen kann u. a. auch spontan gespalten werden (THIELE u. Wober 1961). MASSHOFF u. Mitarb. (1964) fanden den höchsten Anteil an Lysophosphatiden innerhalb der Gesamtphosphatide von autolysierenden Normalorganen im Pankreas des Menschen und des Hundes. LEUPOLD u. KLENK (1965) untersuchten im Rahmen fettchemischer Studien an zahlreichen menschlichen Leichenlebern auch den Einfluß der Autolyse. Sie konnten zeigen, daß die Triglyceride einen besonders starken Abbau erfahren, der den der Phosphatide bei weitem übertrifft.

SINAPIUS zieht seine Folgerungen hinsichtlich der autolysebedingten Lipidveränderungen ausschließlich aus morphologischen Befunden. In den angeführten überwiegend chemischen Untersuchungen von MASSHOFF u. Mitarb. wird die Abspaltung höherer Fettsäuren aus Phosphatiden anhand der papierchromatographischen Darstellung entsprechender Spaltprodukte indirekt bewiesen. Der exakte Nachweis freier höherer Fettsäuren, der mutmaßlichen Beteiligung der Glyceride am Lipidabbau und schließlich die Koordinierung von histochemischen mit chemisch-analytischen Befunden stehen noch aus.

E) Eigene Zielsetzung

Die eigenen Untersuchungen wurden ausgeführt mit dem Ziel, an autoptisch gewonnenen menschlichen Pankreas -

drüsen und an einer systematischen Autolyseserie von Hundepankreas histochemisch und analytisch-chemisch den exakten Nachweis freier Fettsäuren zu führen und gleichzeitig zu zeigen, ob und inwieweit neben den Phosphatiden auch die Glyzeride an postmortalen Spaltvorgängen teilhaben. Zur Unterbauung der lipidchemischen und -morphologischen Befunde und zum Beweis des fermentativen Charakters der Lipidspaltung wurden entsprechende enzym-histochemische Studien an Lipasen und Esterasen in die Untersuchungen einbezogen.

II. Eigene Untersuchungen

A) Material

Für die lipidchemische Untersuchung wurden Proben aus dem Pankreas von 10 gekühlten (0°C) menschlichen Leichen beiderlei Geschlechts im Alter von 21 bis 88 Jahren, während der Obduktion (frühestens 34, spätestens 65 Std. nach dem Tode) entnommen; Feuchtgewicht der für die chemische Untersuchung verwandten Proben ca. 3-7g. Für die enzym- und lipidhistochemische Untersuchung einer Autolysenserie zweimal 6 Proben aus dem Pankreas einer vor einer Stunde verstorbenen 50 Jahre alten Frau. Für die chemische und lipidhistochemische Untersuchung einer Autolysenserie zweimal 10 Proben aus dem normalen Pankreas eines gesunden durch Ausblutung getöteten Hundes; Feuchtgewicht der Proben 1,2-3,5g.

B) Autolyse und chemische Analyse

1) Durchführung der Autolyse

Das unmittelbar nach der Tötung entnommene Pankreas des Hundes wurde unter sterilen Bedingungen in 20 etwa gleich große Stücke aufgeteilt. Zwei Proben wurden sofort verarbeitet, eine davon nach FOLCH extrahiert, die andere in 10-prozentigem Formalin fixiert und histochemisch untersucht. Die restlichen 18 Proben wurden in einer feuchten Kammer bei $18-20^{\circ}\text{C}$ der sterilen Autolyse unterworfen. Von diesen Proben wurden nach bestimmter Autolyse-dauer je zwei entnommen und ebenfalls chemisch und histochemisch untersucht. Die Autolysezeiten betrugen 30 min., 6, 12 und 24 Std.; 3,6 und 12 Tage.

B) 2. Herstellung der Organextrakte

Nach den angegebenen Autolysezeiten wird das Frischgewicht der jeweiligen für die chemische Aufarbeitung vorgesehene Probe bestimmt. Dann werden die Gewebestücke mit der Schere so fein zerkleinert, daß die Teilchen

etwa Stecknadelkopfgröße haben und nach der von FOLCH (1957) angegebenen Methode extrahiert. Mit dieser Methode werden außer den Gesamtlipiden die wasserlöslichen Extraktionsstoffe, die extrahierten Organrückstände und der Wassergehalt erfaßt. In einem Erlenmeyerkolben wird das zerkleinerte Gewebe mit dem etwa achtzehnfachen Volumen eines Chloroform - Methanol - Gemisches (2:1VT) übergossen. Der Kolben wird mit einem Korken verschlossen und ein bis zwei Tage unter gelegentlichem Umschütteln bei Zimmertemperatur belassen. Haben sich die Gewebestückchen auf den Boden gesenkt, so spricht dies dafür, daß sie extrahiert sind. (Durch probeweises Auskochen der extrahierten Rückstände konnten stets nur geringe zusätzliche Lipidmengen gewonnen werden, die kaum 1% der Gesamtmenge betragen und sich chromatographisch nicht vom Kaltextrakt unterscheiden.) Dann wird ein Uhrglas mit einem Faltenfilter tariert, der Inhalt des Erlenmeyerkolbens filtriert, das Filter mit Chloroform-Methanol mehrere Male gut nachgespült und das Uhrglas mit dem auf dem Filter befindlichen extrahierten Gewebestückchen im Brutschrank (Temp. 65°C) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Filtrat, dessen Volumen jetzt etwa das Zwanzigfache des Frischgewichtes beträgt, wird im Meßzylinder genau gemessen und in einen Schütteltrichter gegeben, dann wird genau ein Fünftel des Volumens an destilliertem Wasser zugesetzt und geschüttelt. Nachdem sich die anfangs milchige Flüssigkeit in zwei Phasen getrennt hat (in der Regel nach einigen Stunden), läßt man die untere, d.h. die lipidhaltige Chloroform-Phase in einen Meßkolben ablaufen, füllt mit Chloroform-Methanol bis zur Meßmarke auf und schüttelt gut durch. Zur Bestimmung der Gesamtlipide wird aus dem Meßkolben 1/10 in titrierte Reagensgläser abpipettiert und im Brutschrank bis zur Gewichtskonstanz eingedampft. Die eingedampften, von Lösungsmittel befreiten Lipide sind sirupös und von hellgelber bis braungelber Farbe. Der Rest der Lipidlösung wird bis zur weiteren Aufarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt. Die die wasserlöslichen Stoffe enthaltende Oberphase wird in ein tariertes Becher-

glas gegeben und bis zur Gewichtskonstanz eingedampft. Der auf dem Filter befindliche Organrückstand wird nach dem Trocknen im Brutschrank ebenfalls gewogen und verworfen.

B)3. Bestimmung der Säurezahl (DGF-Einheitsmethoden C-III,7,1953)

Unter der Säurezahl (SZ) versteht man die mg KOH, welche zum Neutralisieren der in einem Gramm Fett enthaltenen freien Säuren verbraucht werden. Der Berechnung liegt die Formel zugrunde:

$$SZ = \frac{\text{titrierte ml KOH minus Nullwert} \times \text{Faktor KOH} \times 1120}{\text{mg eingewogenes Fett}}$$

Zur Bestimmung des Nullwertes wird zunächst Chloroform-Methanol (2:1VT) mit 1/5 des Volumens destilliertem Wasser ausgeschüttelt. Von der Unterphase werden dreimal jeweils 5 ml gegen Phenolphthalein als Indikator (jeweils zwei Tropfen) mit n/50äthanolischer KOH bis zum Farbumschlag titriert. Dann wird in drei titrierte Erlenmeyerkolben jeweils eine Spatelspitze Palmitinsäure (Labor LINDLAR) gegeben und gewogen, in 5ml Chloroform-Methanol-Gemisch gelöst, 2 Tropfen Phenolphthalein zugefügt und mit KOH titriert wie oben. Der Faktor für die verwendete KOH-Lösung wird nach der Formel

$$F = \frac{\text{mg Palmitinsäure} \times 50 \times \text{ml n/50 KOH minus Nullwert}}{256,26}$$

berechnet.

B)4. Dünnschicht-Chromatographie

Zur qualitativen Untersuchung auf freie Fettsäuren (FFS), Di- und Triglyzeride, höhere Aldehyde und freies und verestertes Cholesterin werden Dünnschichtchromatogramme nach der Methode von MANGOLD u. TUNA (1961) hergestellt.

Als Fließgemisch dient Petroläther (Kp.:60-70°C), Diäthyläther und Essigsäure im Verhältnis 87:13:1VT. Zur Herstellung der Platten wird das Gerät der Firma Desaga/Heidelberg

verwandt; die Trägerschicht besteht aus Kieselgel G "Merck", deren mittlere Korngröße 10-40 μ beträgt. Die Trägerschicht wird 0,3mm dick auf 20x20cm große Glasplatten aufgetragen.

Die Gesamtlipidproben werden zu jeweils 2mg strichförmig (1,5cm Länge) oder zu jeweils 0,6mg punktförmig (Durchmesser der Auftragstelle etwa 10mm) aufgetragen. Die Darstellung der getrennten Substanzen auf der Dünnschichtplatte erfolgt durch Besprühen mit einer 5-prozentigen äthanolischen Phosphormolybdänsäurelösung (KAUFMANN u. Mitarb. 1961) und anschließendes Erhitzen auf 100°C.

B) 5. Papierchromatographie

Die Zusammensetzung der Phosphatide wird im papierchromatographischen Verfahren nach THIELE u. WOBER (1961) ermittelt. Es werden jeweils 0,7mg Gesamtlipide im stark eingengten Chloroform-Methanol-Extrakt auf Kieselgelpapier Nr. 289 der Firma Schleicher und Schüll punktförmig aufgetragen und in Diisobutylketon/Methylisobutylketon/Methyläthylketon/Chloroform/Ameisensäure (98%)/Wasser im Verhältnis 30:26:20:110:30:3 VT als Fließgemisch bei 0°C aufsteigend chromatographiert. Als Chromatographiegefäß dient ein durch Schliffdeckel verschließbarer Glaszylinder der Firma Desaga. Auf dem luftgetrockneten Chromatographiepapier werden die getrennten Phosphatide nach JATZKEWITZ u. MEHL (1960) durch Besprühen mit einer wässrigen Bromthymolblaulösung (50mg Bromthymolblau, 1,25g Borsäure, 8ml 1n NaOH und 112ml Aqua. dest.) gefärbt und gleich photographiert. Auf einem anderen Teil der Papierchromatogramme wird zur Darstellung der Phosphatide mit primärer Aminogruppe die Ninhydrinfärbung (CRAMER, 1958) mit 0,2-prozentiger butanolischer Lösung (5% Essigsäure enthaltend) durchgeführt. Zur Entwicklung der Farbflecke wird das besprühte Papier bei etwa 70°C mehrere Stunden getrocknet. Zur Identifizierung der getrennten Lipide in Parallel- und Zusatzversuchen dienten authentische Substanzen (Labor Lindlar).

C) Histochemische Untersuchungen

Von den zu untersuchenden Organstücken wurden nach Fixation in 10-prozentigem Formalin Gefrierschnitte hergestellt und folgenden Färbungen unterworfen: HE, Scharlachrot, Bleisalzprobe auf freie Fettsäuren nach MEYER-BRUNOT und Methylviolett. Die HE- und Scharlachrotfärbung wurde nach der Vorschrift von ROMEIS (1948) ausgeführt.

Färbung zum Nachweis von FFS nach MEYER-BRUNOT (1951): Das Prinzip besteht darin, daß durch Behandlung mit Calciumchlorid in Veronal-Natriumpuffer bei pH 9,4 die Fettsäuren als wasserunlösliche Calciumseifen fixiert werden. Die Behandlung mit einer Bleisalzlösung setzt diese anschließend in Bleiseifen um, die schließlich durch geeignete Reagentien sichtbar gemacht werden können. Der Umweg über die Calciumseifen ist nötig, weil der Zusatz eines Bleisalzes zu der Veronal-Natrium-Lösung zur Ausfällung von Bleioxyd führen würde.

Methylviolettanfärbung: In gepufferter wäßriger Lösung (Zitratpuffer) von Methylviolett bei pH 2,8 und einer Einwirkzeit von 20-30 Minuten werden an flottierenden Gefrierschnitten basophile Lipide elektiv gefärbt (SINAPIUS, 1962). Eindeckung mit Glyzeringelatine.

In einem Parallelversuch sollte geprüft werden, ob, wie SINAPIUS angibt, die Fettsäurereaktion nach MEYER-BRUNOT nur nach kurzer, höchstens dreistündiger Formol-Fixation positiv ist. Es zeigte sich jedoch kein nennenswerter Unterschied zu Vergleichspräparaten, bei denen die Formoleinwirkung länger als drei Stunden gewährt hatte. In einem weiteren Zusatzversuch wurden Gefrierschnitte vor der Färbung nach MEYER-BRUNOT einer Fettextraktion nach SCHMORL unterworfen (15 sek. Einlegen in absoluten Alkohol), um zu prüfen, ob es sich bei den braun angefärbten Teilchen wirklich um Fettsubstanzen handelt.

D) Enzymhistochemische Untersuchungen

1. Napththol-AS-D-acetat.

Mit der Napththol-AS-D-acetat-Methode werden unspezifische Esterasen nachgewiesen. Als Substrat verwendet man α - oder β -Naphthylacetat, aus dem bei der Ester-spaltung α - oder β -Naphthol frei wird. Das α - oder β -Naphthol bildet die auxochrome Gruppe, die bei Zusammentreffen mit dem Diazoniumsalz (chromophore Gruppe) einen Farbstoff ergibt (MC.MANUS, 1960).

2. Tween-Methode zum Nachweis von Lipasen (GOMORI, 1939).

Die wasserlöslichen Palmitin- und Stearinsäureester der komplexen Zucker werden durch das Ferment hydrolysiert, die freigesetzten Fettsäuren bilden Calciumseifen. Diese werden überführt in Bleiseifen und als Bleisulfid sichtbar gemacht. Die Tween-Methode ist vor allem dann angezeigt, wenn man die Anwesenheit von Lipasen bei der Untersuchung von unspezifischen Esterasen ausschließen will (KISZELY u. POSALAKY 1964).

E) Ergebnisse

1. Ergebnisse der chemischen Analyse

Aus Tabelle I ist ersichtlich, daß der Gesamtlipidgehalt in Pankreasdrüsen zehn verschiedener Menschen zwischen 22,5 und 68,4% der Trockensubstanz liegt. Bei hohen Lipidwerten fand sich ausnahmslos eine stärkere interstitielle Lipomatose. Die wasserlöslichen Extraktionsstoffe betragen zwischen 3,8 und 19,4%, die extrahierten Organrückstände zwischen 27,8 und 69,7% der Trockensubstanz. Der Wassergehalt schwankt mit Werten von 82,6 bis 87,2% des Feuchtgewichtes nur wenig. Die Säurezahlen liegen zwischen 6,0 und 77,2 (s. unten).

Tabelle II gibt die entsprechenden Werte für das autolyisierende Pankreas des Hundes wieder. Der Gesamtlipidgehalt liegt zwischen 29,5 u. 34,8% der Trockensubstanz, die

Tabelle I

Pankreas des Menschen

Zeit post mortem (Std.)	In % d.Frischgewicht.		In % d.Trockensubstanz			Säure- Zahl
	Trocken- gewicht	Wasser- gewicht	Gesamt- lipide	wasserl. Extrakt	extrah. Organ- rückstd.	
34	15,3	84,7	68,4	3,8	27,8	6,0
38	16,7	83,3	24,0	6,3	69,7	39,4
41	17,1	82,9	52,1	8,2	39,7	43,1
44	17,4	82,6	22,5	14,9	62,6	61,9
46	15,1	84,9	44,0	11,3	44,7	35,1
48	16,8	83,2	29,4	14,4	56,2	44,5
49	13,7	86,3	23,2	16,4	60,4	49,5
50	15,0	85,0	55,2	6,6	38,2	46,2
52	16,6	83,4	52,7	5,4	41,9	16,3
65	12,8	87,2	45,3	19,4	35,3	77,2

Tabelle II

Autolysierendes Hundepankreas

Dauer der Autolyse (Std.)	In % d.Frischgewicht.		In % d.Trockensubstanz			Säure- zahl
	Trocken- gewicht	Wasser- gewicht	Gesamt- lipide	wasserl. Extrakt	extrah. Organ- rückstd.	
0	23,7	76,3	32,1	4,8	63,1	3,0
1/2	25,0	75,0	29,5	3,8	66,7	7,0
1	25,7	74,3	33,9	4,5	61,6	9,8
3	23,7	76,3	34,7	3,9	61,4	7,0
6	24,2	75,8	31,6	5,2	63,2	20,5
12	24,1	75,9	34,8	7,3	57,9	12,2
24	22,1	77,9	30,4	8,9	60,7	24,9
72	21,3	78,7	30,6	9,5	59,9	62,2
144	21,3	78,7	30,4	14,3	55,3	110,7
288	18,4	81,6	30,5	14,1	55,4	192,7

wasserlöslichen Extraktionsstoffe betragen zwischen 3,8 und 14,3%, der extrahierte Organrückstand zwischen 55,3 und 66,7% der Trockensubstanz. Der Wassergehalt schwankt zwischen 74,3 und 81,6% des Feuchtgewichtes. Die Säurezahlen liegen zwischen 3,0 und 192,7; ein Ansteigen mit fortschreitender Autolyse ist unverkennbar.

Auf dem in Abbildung 1 wiedergegebenen Dünnschichtchromatogramm der Lipidextrakte aus menschlichen Pankreasdrüsen wurden die Proben von links nach rechts nach ansteigender Säurezahl aufgetragen. Erwartungsgemäß findet sich eine eindeutige Zunahme der freien Fettsäuren, die von einer Abnahme der Triglyzeride begleitet wird. Proben, die reichlich FFS enthalten, sind z. T. auch reich an Fettsäuremethylestern. Mit der Abnahme der Triglyzeride scheint eine geringe Zunahme der Diglyzeride einherzugehen. Eine Beziehung zwischen Höhe der Säurezahl und Gesamtlipidgehalt besteht nicht.

In Abbildung 2 findet sich das Dünnschichtchromatogramm der Lipidextrakte aus autolysierendem Hundepankreas. Den auffälligsten Befund bieten auch hier wiederum die freien Fettsäuren. Während sie in den frischer aufgearbeiteten Proben kaum in Erscheinung treten, zeigen sie bereits nach 12stündiger Autolyse eine deutliche Zunahme, die sich bei den folgenden Proben weiter verstärkt und bei der Probe nach 12tägiger Autolyse ihr Maximum erreicht. Die Triglyzeride nehmen in dem Maße ab, in dem die Fettsäuren zunehmen. Fettsäuremethylester treten in unterschiedlichem Umfang auf. Hinsichtlich der Diglyzeride ist keine konkrete Aussage möglich.

Abbildung 3 zeigt ein Dünnschichtchromatogramm, in welchem durch Zusatzversuch geprüft werden sollte, ob es sich bei dem auf FSME verdächtigen Fleck tatsächlich um diese handelt. Nach Zusatz von reinen FSME (Labor LINDLAR) zu den Lipidextrakten wird der verdächtige Fleck erheblich intensiver. Nach Besprühen der Dünnschichtplatte mit dem SCHIFFschen Reagens zeigen sich im Gegensatz zu manchen

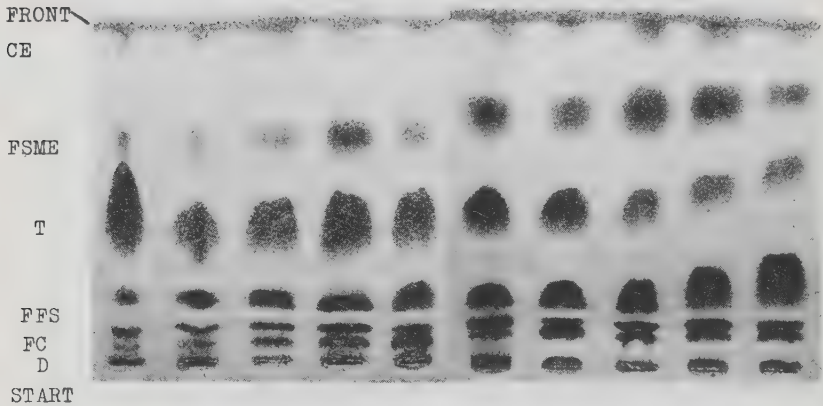


Abb.1 Dünnschichtchromatogramm der Lipidextrakte aus 10 menschlichen Pankreasdrüsen, nach steigender Säurezahl (6-77) aufgetragen. Auftragsmenge 2 mg. CE Cholesterinester, FSME Fettsäuremethylester, T Triglyceride, FFS freie Fettsäuren, FC freies Cholesterin, D Diglyceride.

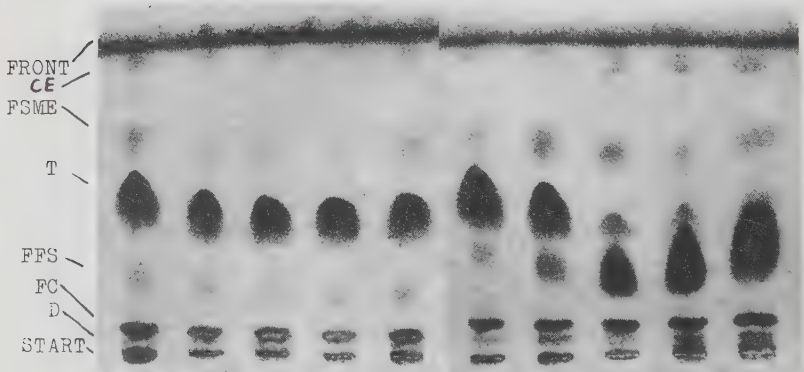


Abb.2 Dünnschichtchromatogramm der Lipide des autolysierenden Hundepankreas (frisch, 1/2, 1, 3, 6, 12, 24, 72, 144, 288 Std.). Auftragsmenge 2 mg. Abkürz.w. Abb.1

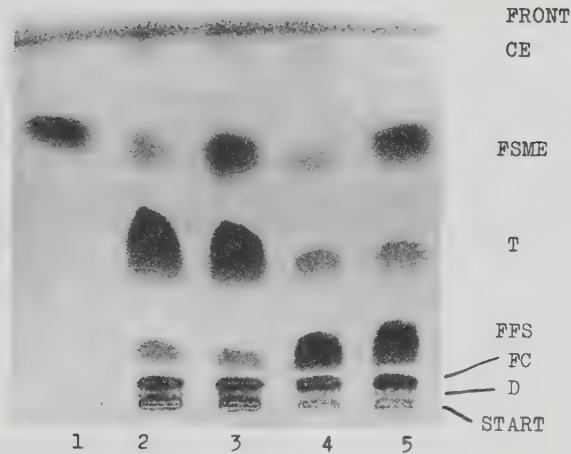


Abb.3 Dünnschichtchromatogramm zur Prüfung auf FSME. Auftragsmenge 2 mg. 1.reine FSME, 2. 24-Std.-Probe aus Abb.2, 3. 24-Std.-Probe aus Abb.2 mit Zusatz von reinem FSME, 4. 72-Std.-Probe aus Abb.2, 5. 72-Std.-Probe aus Abb.2 mit Zusatz von reinem FSME. (Diglyceride sind nicht eindeutig abgetrennt,) Abkürzungen wie Abb. 1.

anderen Organen wie beispielsweise dem Myocard (ZAKI, 1965) keine freien höheren Aldehyde.

Das Papierchromatogramm des autolysierenden Hundepankreas zeigt - entsprechend den zitierten Untersuchungen von MASSHOFF u. Mitarb. (1964) - gegen Ende der Serie starken Abfall des Colamin-Kephalin und des Lecithin bei erheblicher Zunahme der Lysophosphatide. Die in der Reihenfolge der Abb. 1 aufgetragenen Extrakte aus menschlichem Pankreas lassen ein mit der Zunahme der FFS korrelierbares Verhalten der betreffenden Phospholipide vermissen. Daraus geht hervor, daß die Menge der auftretenden FFS im wesentlichen der der Triglyceride umgekehrt proportional und nicht so sehr durch das Ausmaß der Phosphatidspaltung bedingt ist.

E) 2. Ergebnisse der histochemischen und enzymhistochemischen Untersuchungen

Um festzustellen, ob die Färbung nach MEYER-BRUNOT und die Methylviolett-Färbung an authentischem Material angehen, wurden unter Verwendung von flüssigen freien Fettsäuren und Lipoidgemischen aus ungesättigten höheren Fettsäuren (Labor LINDLAR) folgende Objektträger-Ausstrichpräparate hergestellt, nach dem Verdunsten des Lösungsmittels gefärbt und histologisch untersucht:

- a) 0,15 mg FFS in Chloroform
- b) 2,5 γ Lipoidgemisch + 0,05 ml FFS
- c) 1 γ Lipoidgemisch + 0,05 ml FFS
- d) 2,5 γ Lipoidgemisch rein
- e) 1 γ Lipoidgemisch rein

Testsubstanz war 0,1 g FFS in 3 ml Chloroform gelöst.

Im Vorversuch mit authentischen Substanzen sind bei der Färbung nach MEYER-BRUNOT schon makroskopisch die Proben mit und ohne FFS zu unterscheiden. Erstere enthalten hellbraune bis dunkelbraune Flecken, die in unregelmäßiger

Dichte über das Präparat verteilt sind. Auf den beiden Präparaten, die nur das Lipoidgemisch enthalten, erkennt man lediglich die gelbliche Farbe der Glyzeringelatine, die makroskopisch frei von Partikeln erscheint.

Histologisch finden sich in dem FFS-enhaltenden Präparat unregelmäßig verteilt rundliche braune Flecke von unterschiedlicher Größe. Die Farbe wechselt zwischen hellbraun bis schokoladenbraun, manche Flecke sind homogen gefärbt, manche setzen sich aus Ansammlungen feinsten Tröpfchen zusammen, letztere erscheinen auch einzeln stehend. Außerdem sieht man braune schollenartige Gebilde. Die verschiedene Farbe der Flecke erklärt sich z.T. aus der mehr oder weniger starken Intensität der Reaktion. Die Form der positiv reagierenden Bezirke ist nicht zuletzt durch die Verteilung der FFS auf dem Objektträger bedingt. Den für die FFS beschriebenen Befund bieten auch die beiden Präparate, bei denen den FFS ein Lipoidgemisch zugesetzt wurde. Die Präparate, die nur das Lipoidgemisch enthalten, bestehen lediglich aus Ansammlungen von ungefärbten Kristallnadeln.

Auch die fünf Präparate nach Methylviolettfärbung lassen schon makroskopisch erkennen, wo FFS enthalten sind. Bei diesen findet sich eine bedeutend stärkere, mehr blau getönte Violettfärbung, während sich bei den Lipoidgemischen ohne Zusatz von FFS nur eine ganz schwache hellviolette Färbung zeigt. Das Präparat, das nur FFS enthält, zeigt mikroskopisch verschieden geformte rundliche und streifenförmige Flecken, z.T. mit feinen Körnchen von preußischblauer Farbe als Ausdruck positiver Reaktion. Die Körnchen bilden entweder dichte Ansammlungen oder sind fein verteilt. Finden sich sehr feine blaue Körnchen zwischen entsprechend feinen violetten, so ist die Entscheidung bezüglich FFS oft schwierig. Bei Zusatz des Lipoidgemisches finden sich in vielen violetten Flecken Kristalle. In einigen Flecken erkennt man entsprechend der Reaktion preußischblaue Körnchen. Die Präparate, die ausschließlich Lipoidgemisch enthalten, bestehen fast nur aus

farblosen bis leicht gelblichen radiär angeordneten Kristallnadeln, die im polarisierten Licht aufleuchten und z.T. Auslöschphänomen zeigen. Es ist nicht immer möglich, bei den Kristallbildungen zu unterscheiden, ob es sich um kristallisierte Fettstoffe oder um den Farbstoff handelt.

Das menschliche Pankreas zeigt bis zu etwa 40 Stunden post mortem im allgemeinen eine gut erhaltene Parenchymstruktur. Nach 40 Stunden beginnt in den Acinuszentren die Dissoziation, die Zellgrenzen werden verschwommen. Nach 65 Stunden sind praktisch keine intakten Parenchymzellen mehr zu erkennen, es findet sich nur noch eine körnige, weitgehend strukturlose Masse. Der Fettgehalt der Präparate, insbesondere das interstitielle Fettgewebe, ist recht unterschiedlich beschaffen. In allen Präparaten findet sich eine deutlich positive Reaktion bei der Färbung nach MEYER-BRUNOT. Von dem gelbbraun gefärbten Parenchym heben sich meist intrazellulär gelegene braune Körnchen ab. Die Methylviolettreaktion ergibt in allen Präparaten positiven Ausfall.

Das autolysierende Pankreas des Hundes läßt im HE-gefärbten Präparat bis zu etwa 24 Stunden Drüsenstruktur erkennen. Nach drei Tagen beginnt die Dissoziation der Acini und der Zellen, es finden sich Autolysebezirke, in denen sich die Kerne nicht mehr anfärben. Nach sechs Tagen ist die Struktur bis auf die Bindegewebssepten aufgelöst, nur in diesen färben sich noch die Kerne, im übrigen besteht das Präparat weitgehend aus sog. Autolysekörnern. Nach 12 Tagen ist die Strukturauflösung so weit fortgeschritten, daß sich - vom netzartigen Bindegewebe abgesehen - das Präparat im ganzen gleichmäßig hellrot färbt. Die Scharlachrotfärbung bringt nach 6-stündiger Autolyse zum ersten Mal sehr fein verteiltes intrazelluläres Fett zur Darstellung. Dieses tritt bis zu einer Autolysezeit von drei Tagen in etwa gleichbleibender Menge auf. Nach sechs Tagen finden sich außerdem netzige, zart sudanophile Substanzen über das Präparat verteilt, nach 12-tägiger Autolyse besteht das

Präparat nur noch aus sudanophilen netzig-körnigen Strukturen, an wenigen Stellen finden sich tropfige Lipide.

Bei der Färbung nach MEYER-BRUNOT heben sich aus dem homogen gelblich gefärbten Präparat erstmalig nach sechs Stunden vereinzelt dunkelbraune Körnchen hervor. Diese sind nach 12 und 24 Stunden in etwa gleicher Menge vorhanden, nach dreitägiger Autolysezeit haben sie an Größe gewonnen und anscheinend auch an Zahl zugenommen. Nach 6 und 12 Tagen ist die Zunahme der positiven Teilchen deutlich zu erkennen. (Abb.4) Die Methylviolett-färbung ergibt erst nach etwa 24-stündiger Autolyse in Form von preußischblauen feinen intrazellulären Körnchen positiven Ausfall. (Abb.5)

Die Aktivität der unspezifischen Esterasen, die sich fast ausschließlich um die Acinuszentren gelagert befinden, nimmt gegenüber Naphthol-AS-D-acetat in der Autolysezeit von 2 bis 12 Stunden langsam, dann bis zu etwa 48 Stunden stark zu. Sich unspezifisch anfärbende bräunliche Autolyseprodukte, die schon nach 48 Stunden in geringer Menge auftreten, nehmen zu, die Reaktion auf Esterasen in Form leuchtend roter Farbe wird schwächer. Nach 6-tägiger Autolyse ist bei völliger Gewebsauflösung der starke Rückgang der Reaktion unverkennbar. Ebenso wie die Reaktion der unspezifischen Esterasen mit Naphthol-AS-D-acetat nimmt auch die der Lipasen mit Tween bis zu 12 Stunden Autolyse langsam, bis zu 48 Stunden stark zu. Die positive Reaktion des Substrates mit Lipasen in Form einer dunkelbraunen Färbung ist nach 72 Stunden schwächer geworden. Nach 6-tägiger Autolyse ist praktisch keine Lipaseaktivität mehr vorhanden.

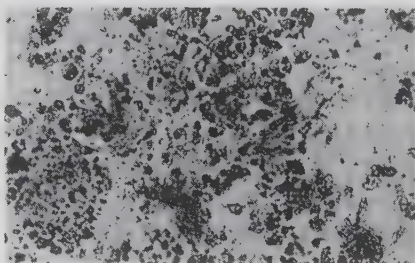
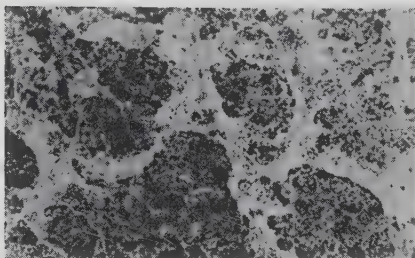
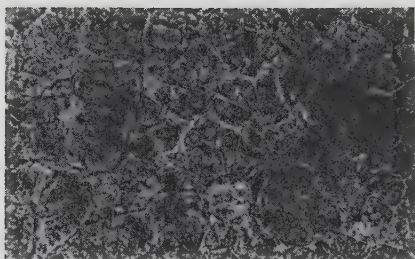


Abb. 4 Hundepankreas nach 12-stdg., (oben) 3- (Mitte)
und 12-tg. (unten) Autolyse. Färbung nach MEYER-
BRUNOT. Vergr. 250 mal

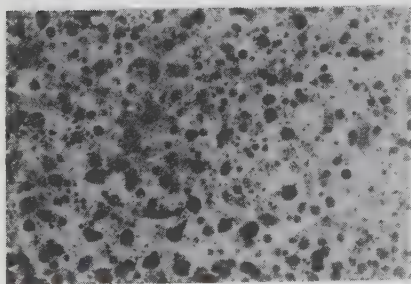
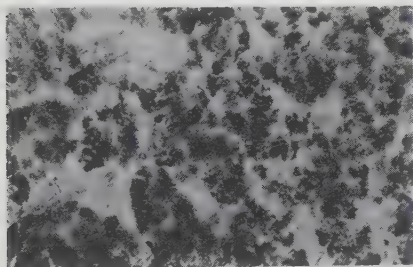
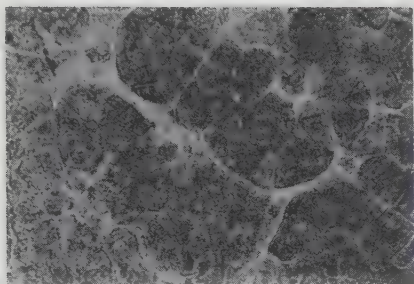


Abb.5 Hundepankreas nach 12-stdg. (oben), 3- (Mitte)
und 12-tg.(unten) Autolyse. Methylviolett.
Vergr. 250 mal!

III. DISKUSSION

Zur Frage der Gegenwart von Keimen im verwendeten Untersuchungsgut ist festzustellen, daß die Pankreasproben aus menschlichen Leichen mikroskopisch bakterienfrei waren, und daß sich in keiner Probe ein Hinweis auf bakterielle Zersetzung gewinnen ließ. Während der Autolyse des Hundepankreas in der feuchten Kammer ließen sich sterile Bedingungen nicht vollständig aufrechterhalten, da bei der wiederholten Entnahme von zu analysierenden Proben zumindest Luftkeime auf die autolysierenden Pankreasstücke gelangten. Die nach mehrtägigen Autolysezeiten histologisch nachgewiesenen vereinzelt kleinen Bakterienkolonien dürften indessen kaum einen heterolytischen Einfluß ausgeübt haben.

Die Darstellung freier Fettsäuren mit Hilfe der Bleisalzmethode nach MEYER-BRUNOT ist unspezifisch. SINAPIUS (1962) fand alle Lipidteilchen präzise und zunehmend intensiv braun dargestellt. Bei der künstlichen Autolyse änderte sich jedoch im Verlauf weniger Stunden das Verhalten der Fett-Tropfen, indem sie einen gelbbraunen bis dunkelbraunen Farbton annahmen; die Farbsintensität war am Rande der Tropfen meist am stärksten. Sowohl bei spontaner als auch bei künstlicher Autolyse könne man bereits in den Frühstadien feine 0,5-3 μ im Durchmesser betragende Lipidteilchen sehen. Diese neigten zur örtlichen Aggregation in Form kleiner Haufen, die durch keinen anderen Lipidnachweis erfaßt würden. Die Ergebnisse der eigenen morphologischen Untersuchungen entsprechen denen von SINAPIUS. Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß sich der Lipidcharakter der betreffenden Partikel durch geeignete Extraktionsverfahren am histologischen Schnittpräparat erhärten ließ.

Zur Färbung mit Methylviolett schreibt SINAPIUS (1963), daß sie eine nahezu selektive Darstellung der Autolyse-lipide bewirke, und daß das Ergebnis mit dem der MEYER-BRUNOT-Methode korrespondiere. Auch dies fand sich in

eigenen Untersuchungen bestätigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei hydrolysierende Enzyme histochemisch untersucht. Die Lipasen und unspezifischen Esterasen gehören zu den gruppenspezifischen bzw. nichtspezifischen Carbonsäureesterasen. Es ist kaum möglich, ihre Wirkung scharf gegeneinander abzugrenzen, weil hinsichtlich der Substrate sicher Überschneidungen bestehen. Die scheinbare Differenz dürfte mehr quantitativer Natur sein. Allerdings lassen sich durch Bestimmung des pH-Optimum verschiedener Substrate, verschiedener Aktivatoren und Inhibitoren gewisse Unterschiede ermitteln. So wurde gefunden, daß Lipasen relativ langkettige Fettsäuren spalten, während die unspezifischen Esterasen hauptsächlich die kurzkettigen Fettsäureester (C_2-C_4) einfacher Alkohole und Phenole spalten (LEUTHARDT). Es ist aber nicht möglich, die in der eigenen Untersuchungen nachgewiesene Lipidspaltung auf die Fermente der einen oder der anderen Gruppe zu beziehen, zumal die Fettsäuren nachgewiesenermaßen aus mehreren Substraten wie Glyzeriden und Phosphatiden stammen.

Bezüglich der Säurezahl in Lipidextrakten ist zu bedenken, daß bei der Titration nicht nur freie Carboxylgruppen, sondern auch saure Gruppen der Phosphatide erfaßt werden. Bei der Komplexität der autolysebedingten Abbauvorgänge besonders auch an den Phosphatiden (MASSHOFF u. Mitarb., 1964) ist kaum zu entscheiden, welche Gruppen im jeweiligen Stadium der Autolyse überwiegend den sauren Charakter bedingen. Umso überraschender erscheint daher bei den vorliegenden Untersuchungen an menschlichen Pankreasdrüsen die Übereinstimmung von Höhe der Säurezahl mit Größe des FFS-Flecks im Dünnschichtchromatogramm.

Die Abnahme der Triglyceride synchron zur Zunahme der FFS, wie sie sich im autolysierenden Pankreas von Mensch und Hund darbietet, ist keineswegs selbstverständlich. Sie tritt beispielsweise nicht in Rinde und Mark der

Niere auf (LINDLAR, persönl.Mittlg.); hier stammen die FFS praktisch ausschließlich aus Phosphatiden. FFS können außer aus Glyceriden und Phosphatiden auch aus Plasmalogen entstehen, indem die enzymatisch, säurekatalytisch oder auch spontan abgespaltenen höheren Aldehyde im weiteren Verlauf der Autolyse zu Fettsäuren oxydiert werden. Dieser Weg wird im Gegensatz zum Myocard (ZAKI, 1966) im Pankreas offenbar nicht beschritten, da in diesem, wie bereits hervorgehoben, chromatographisch keine freien höheren Aldehyde nachweisbar werden. Fettsäureabspaltung aus Cholesterinestern scheint nach bisherigen Untersuchungen an zahlreichen Organen (LINDLAR, persönl.Mittlg.) so gut wie ausgeschlossen. Cholesterin wie auch seine Ester zählen, was die Autolyse betrifft, zu den stabilen Lipiden.

Zum dünnschichtchromatographischen Nachweis von Fettsäuremethylestern (FSME) sei vermerkt, daß diese nach den Untersuchungen von MANGOLD (1961) in Extrakten aus natürlichem Ausgangsmaterial vorkommen sollen. Nach ZAKI (1966) finden sie sich in kleiner Menge beispielsweise im Herzmuskel der Ratte und des Meerschweinchens, nicht dagegen bei Huhn, Kaninchen und Hund. In Chloroform-Methanol-Extrakten nehmen sie, vor allem wenn diese ungekühlt aufbewahrt werden, zu. Da die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Extrakte sämtlich Tage bis Wochen teils bei Raumtemperatur lagerten, ist auch hier damit zu rechnen, daß es sich wenigstens zum Teil um Artefakte handelt.

IV. Zusammenfassung

Durch die lipidchemische Analyse verschiedener Pankreasdrüsen des Menschen und eines Pankreas des Hundes nach verschieden langer Autolysezeit wurde mit Hilfe der Säurezahlbestimmung eine Zunahme von höheren freien Fettsäuren mit fortschreitender Autolyse wahrscheinlich gemacht. Diese Zunahme wurde durch den dünnschichtchromatographischen Nachweis freier höherer Fettsäuren bewiesen; sie geht mit einer ebenfalls chromatographisch nachgewiesenen Abnahme der Triglyzeride einher.

Morphologisches Äquivalent der FFS dürften die mit der Methode nach MEYER-BRUNOT unter dunkelbrauner und die mit Methylviolett unter tiefblauer Farbgebung reagierenden Teilchen sein. Obwohl die Methode nach MEYER-BRUNOT nicht spezifisch für FFS ist, sondern nach Angaben des Entdeckers auch bei Seifen, Nucleoproteiden und bestimmten Phosphaten einen positiven Ausfall ergeben soll, darf aus der in den vorliegenden Untersuchungen nachgewiesenen Koinzidenz zwischen dem Anstieg der Säurezahl, dem Auftreten und der Zunahme entsprechender Flecke auf dem Dünnschichtchromatogramm und den histochemisch eindrucksvollen dunkelbraunen, bzw. tiefblauen Teilchen geschlossen werden, daß es sich hierbei um freie Fettsäuren handelt.

Einen weiteren Hinweis für die Lipoidnatur der beschriebenen Teilchen liefert die mit fortschreitender Autolyse zunehmende Sudanophilie, wobei die Teilchen meist innerhalb der sudanophilen Tröpfchen auftreten. Sie verschwinden bei der Alkoholextraktion, während gelbliche und tiefschwarze Reaktionsprodukte im Gewebe liegen bleiben. Reine FFS, allein oder mit anderen Lipiden gemischt, ergeben bei den entsprechenden Färbungen gleichen positiven Ausfall wie die betreffenden Teilchen in autolisierendem Gewebe.

Auf die Frage nach dem Mechanismus der zum Auftreten von FFS führenden Lipidspaltung kann auf Grund enzymhistoche-

mischer Untersuchungen gesagt werden, daß während der Dauer der Autolyse im Pankreas lipidspaltende Enzyme von der Art der Esterasen und Lipasen wirksam sind. Eine völlige Erschöpfung der Enzymaktivität konnte selbst nach 6-tägiger Autolysedauer nicht festgestellt werden. Das Ergebnis der enzymhistochemischen Untersuchungen berechtigt zu dem Schluß, daß die höheren Fettsäuren durch die Aktivität der Esterasen und Lipasen aus Glyzeriden und Phosphatiden freigesetzt werden.

Die chromatographisch bei allen Proben in unterschiedlicher Menge nachgewiesenen Fettsäuremethylester stellen möglicherweise Artefakte dar, die bei der Aufbewahrung der methanolhaltigen Extrakte durch Veresterung freier Fettsäuren entstehen.

V. L I T E R A T U R

- P. BOHLEY u. H. HANSON: Bestimmungen des Lebereiweißabbaus.
Hoppe-Seyler's Ztschr.f.physiol. Chemie, 337, 16-31 (1964)
- CRAMER, F.: Papierchromatographie
4. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1958)
- DGF-Einheitmethoden: C III, 7 (1953)
- DIETRICH, A.: Die an aseptisch aufbewahrten Organen auftretenden morphologischen Veränderungen in ihrer Beziehung zur Autolyse.
Verl.d.Dtsch.Path.Ges., Kassel, 6, 81-86 (1903)
- FOLCH, J., M. LEES and G. H. SLOANE STANLEY: A simple method for the isolation and purification of the total lipids from animal tissues.
J. biol. Chem. 226, 497-509 (1957)
- GOSSNER, W.: Untersuchungen über das Verhalten der Phosphatasen und Esterasen während der Autolyse. Virch. Arch. path. Anat., 327, 304-313 (1955)
- GOMORI, G.: Proc. Soc. exp. Biol., New-York, 42, 33 (1939)
- HISTOCHEMISCHE METHODEN, Lieferg. 17, 21 (1959)
- JATZKEWITZ, H. und E. MEHL: Zur Dünnschichtchromatographie der Gehirn-Lipoide, ihrer Um- und Abbau-
produkte.
Hoppe-Seyler's Ztschr.f.physiol. Chem., 320, 251-257 (1960)
- KAUFMANN, H. B., Z. MAKUS u. F. DEIKE: Die Dünnschichtchromatographie auf dem Fettgebiet. II Trennung der Cholesterin - u. Fettsäureester, Fette, Seifen u. 63, 235-238 (1961)
- KISZELY, G. u. Z. POSALAKY: Mikrotechnische und histochemische Untersuchungsmethoden Akadémia: Kiadó, Verlag der ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest (1964)

LETTERER, E.:

Allgemeine Pathologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart
(1959)

LEUPOLD, F., u.
H.D.KLENK:

Die Lipoidzusammensetzung von
normalen und pathologischen
Lebern des Menschen. Dtsch. Arch. f.
Klin. Med., 210, 238-258 (1965)

LEUTHARDT, F.:

Lehrbuch der physiolog. Chemie,
14. Aufl., Verlag de Gruyter,
Berlin (1961)

MAGEE, W.L., J.GALLAI-
HATCHARD, H.SANDERS and
R.H.S. THOMPSON:

The purification and properties
of phospholipase A from human
pancreas.
Biochem. I., 83, 17-25 (1962)

MANGOLD, H.K. and
N.TUNA:

Analysis of tissue lipids by TLC
and GLC. Fed.Proc., 20, 268 (1961)

MC.MANUS, J.F.A. and
R.W. MOWRY:

Staining methods, Histologic and
Histochemical. Hoeber Medical Division,
New York, 171-172 (1960).

MASSHOFF, W.,

F.LINDLAR u.H.J.STOLPMANN: Morphologische und biochemische Un-
tersuchungen zur Autolyse von Leber
und Pankreas. Virch. Arch. path. Anat.,
337, 340-352, (1964)

MATTHES, P.:

Über Autolyse der Plazenta.
Münch.med.Wschr., 49, 33, München,
J.F. Lehmann Verlag
(1902)

- MEYER-BRUNOT, H.G.: Zur histochemischen Unterscheidung von gespaltenem und ungespaltenem Fett. Z.Wiss.Mikr.60, 476-480 (1951/52)
- MÜLLER, F.: Bedeutung der Autolyse bei einigen krankhaften Zuständen. Münch., med. Wschr. 49, 764, München, J.F. Lehmann Verlag (1902)
- PFÖRRINGER, S.: Über die Selbstauflösung am Pankreas Virch.Arch.158, 126-147, (1899)
- RANDERATH, K.: Dünnschicht-Chromatographie. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1962)
- ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. Leibniz Verlag, 15. Aufl., München (1948)
- SCHLEYER, F.: Postmortale klinisch-chemische Diagnostik und Todeszeitbestimmung mit chemischen und physikalischen Methoden. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1958)
- SCHMORL, G.: Die pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden. Hrsg. von P.Geipel, 16. Aufl., Leipzig (1934)
- SINAPIUS, D.: Autofermentative Basophilie, Quellung und Auflösung von Fetttropfen der fixierten Leber. Histochemie 2, 150-169 (1962)
- SINAPIUS, D. und H.KALBFLEISCH: Zur Morphologie und Histochemie der Lipide normaler Säugerlebern bei künstlicher Autolyse. Virch.Arch. path.Anat., 336, 311-325 (1963)
- THIELE, O.W. und W.WOBER: Zur papierchromatographischen Trennung von Phosphatiden auf einem neuartigen Kieselgelpapier. Hoppe-Seyler's Z.f.physiol.Chem., 326, 89-93 (1961)

WALLACH, D.F.H., J.SODERBERG and L.BRICKER:

The phospholipids of Ehrlich ascites carcinoma cells. Composition and intracellular distribution Cancer Res. 20, 397-402 (1960)

ZAKI, I.A.:

Lipidchemische Untersuchungen an Leichenherzen. Dissertation, Hamburg. (1966)

Herrn Priv. Doz. Dr. F. Lindlar danke ich
für die Anregung zu dieser Arbeit und
für das stets fördernde Interesse, das er
mir entgegengebracht hat.

Lebenslauf

Am 4. 3. 1941 wurde ich, Marianne M ü t t e r , als Tochter des Arztes Dr. med. Gustav-Adolf Jöllenbeck und seiner Ehefrau Dr. med. Luise Jöllenbeck, geb. Drenckhahn, in Kiel geboren.

Von 1947 bis 1950 besuchte ich die Grundschule in Petersdorf/Fehmarn, von 1950 bis 1955 die Mittelschule in Burg/Fehmarn, von 1955 bis 1960 das Freiherr-vom-Stein-Gymnasium in Oldenburg/Holstein, wo ich 1960 das Abitur ablegte. Anschließend studierte ich Medizin in Kiel, Freiburg/Breisgau und Berlin. Ich schloß mein Studium 1966 in Berlin mit dem Staatsexamen ab.

